



(12) Offenlegungsschrift
(10) DE 42 04 012 A 1

(51) Int. Cl. 5:
C 08 B 37/04

C 08 L 5/04
A 61 K 9/48
A 61 K 9/20
A 23 L 1/0532
A 23 L 1/054
B 01 D 57/02
B 01 D 61/24
A 61 L 27/00
A 61 K 6/10

DE 42 04 012 A 1

(21) Aktenzeichen: P 42 04 012.4
(22) Anmeldetag: 12. 2. 92
(43) Offenlegungstag: 19. 8. 93

(71) Anmelder: Zimmermann, Ulrich, Prof. Dr., 8702 Waldbrunn, DE	EP 03 34 167 A1 EP 02 75 336 A1 EP 02 65 875 A1 EP 00 07 690 A1 WO 91 11 206 A1 WO 91 11 205 WO 91 09 119 WO 91 07 951 WO 90 01 954 SU 14 32 064
(74) Vertreter: Pöhner, W., Dipl.-Phys. Dr.rer.nat., Pat.-Anw., 8700 Würzburg	GUMS AND STABILISERS FOR THE FOOD INDUSTRY 5, Oxford University Press 1990, S.475-481; ULLMANN's Encyclopedia of Ind.Chemistry, Vol.A, Weinheim 1987, S.287; Lebensmittel-Lexikon, Leipzig 1981, S.33; JP 57-149301 A. In: Patents Abstracts of Japan, C-140, Dec.16, 1982, Vol.6, No.257;
(72) Erfinder: Zimmermann, Ulrich, Prof. Dr., 8702 Waldbrunn, DE; Federlin, Konrad, Prof. Dr., 6300 Gießen, DE; Zekorn, Tobias, Dr.med., 6300 Gießen, DE; Klöck, Gerd, Dr., 8702 Zell, DE	
(56) Für die Beurteilung der Patentfähigkeit in Betracht zu ziehende Druckschriften: DE-OS 23 35 535 AT 3 39 710 US 44 14 198 EP 04 69 745 A2 EP 03 66 868 A1	
(54) Mitogenfreie Substanz, deren Herstellung und Verwendung	
(57) Vorgeschlagen wird eine mitogenfreie Substanz, die Mischpolymere von 10 bis 90 Molprozent Guluronsäure und aus jeweils auf 100% ergänzende Mannuronsäure aufweist, die ein Molekulargewicht von 10000 bis 500000 Dalton besitzen. Des Weiteren werden Verfahren zu deren Herstel- lung sowie Verwendung vorgeschlagen.	

DE 42 04 012 A 1

Beschreibung

Die Erfindung betrifft eine mitogenfreie Substanz unter Verwendung von Guluron-Säure oder Mannuron-Säure, deren Herstellung sowie Verwendung.

Gemäß üblicher Terminologie definiert der Begriff mitogen jene Substanzen, die Zellen zu Teilungen anregen, die andernfalls, d. h. ohne Einwirkung dieser Substanz, nicht zu einer Teilung geführt würden. Die hierdurch im Organismus ausgelösten Reaktionen sind von der Norm abweichend und können sich als allergische, immunologische und pyogene (Entzündungs-)Reaktionen äußern. Keiner näheren Erläuterungen bedarf, daß die Schaffung und Herstellung mitogenfreier Substanzen für den Kontakt mit lebenden Organismen in Biologie und Medizin von allergrößtem Interesse sind.

Auf dem Gebiet der Implantatchirurgie ist der Einsatz mitogenfreier Substanzen von allergrößter Bedeutung, um die andernfalls induzierten und zur Abstoßung des Implantats führenden immunologischen Reaktionen zu unterdrücken. Bei zahlreichen Erkrankungen werden lebende Zellen in den Organismus eingebracht, die einerseits durch Nährstoffe versorgt werden und andererseits entsprechend dem jeweiligen Bedarf Zellsekrete, Hormone oder dgl. produzieren und abgeben, um eine Unterproduktion oder den völligen Ausfall der körpereigenen Zellen zu kompensieren. Eine der bekanntesten Erkrankungen dieser Art ist die Diabetes, bei der zwar die Fehlmenge des benötigten Insulins im zeitlichen Abstand durch wohldosierte äußere Zufuhr ausgeglichen werden kann, bei der jedoch festzustellen ist, daß eine exakte Dosierung über den Tagesverlauf im Sinne eines Regelsystems nie realisierbar ist, so daß Schwankungen und Abweichungen vom Idealwert unvermeidbar sind. Dieser Nachteil läßt sich durch Implantieren lebender Zellen in den Organismus beseitigen, wobei jedoch zur Unterdrückung immunologischer Reaktionen die Zellen in Kapseln unterzubringen sind, die ihrerseits folgenden Anforderungen genügen müssen: Zum einen muß eine ungehinderte Diffusion durch die Wandungen im Sinne einer Zufuhr von Nährstoffen und andererseits die Abgabe der Zellsekrete, Hormone und dgl. nach außen gewährleistet sein. Weiter muß sichergestellt sein, daß das Implantat keine Immunreaktionen hervorruft, d. h. mitogenfrei ist, was sich u. a. andernfalls dadurch äußern würde, daß sich die Kapsel oberflächlich nach einer gewissen Dauer mit fibrotischem Bewuchs zusetzen und die unabdingbare Zirkulation und Austausch von Nährstoffen und Zellsekreten unterbinden würde.

Ziel vorliegender Erfindung ist zunächst die Schaffung einer mitogenfreien Substanz, die auch nach langerem Kontakt mit dem lebenden Organismus keine allergischen, immunologischen und pyrogenen Reaktionen zeigt sowie deren Herstellung und Verwendung.

Gelöst wird diese Aufgabe erfindungsgemäß durch Mischpolymere, die aus 10 bis 90 Molprozent Guluronsäure und aus jeweils auf 100% ergänzend Mannuronsäure bestehen sowie ein Molekulargewicht der Mischpolymere von 10 000 bis 500 000 Dalton.

Die mitogenfreie Substanz weist als unter Umständen einzige Komponente ein Mischpolymer aus Guluronsäure und Mannuronsäure, wobei die molare Zusammensetzung der Guluronsäure 10 bis 90 Prozent und der Rest Mannuronsäure beträgt. Eine Aussage über die Größe des sich durch Polymerisation ausbildenden Mischpolymers ist aufgrund des vorgegebenen Molverhältnisses beider Säuren noch nicht festgelegt. Es kön-

nen demnach auch Mischpolymere mit niedrigem Molekulargewicht beschrieben werden, die die gestellten Anforderungen nicht erfüllen. Zusätzliche Voraussetzung ist deshalb, daß das Mischpolymer ein Molekulargewicht von 10 000 bis 500 000 Dalton besitzt. Diese Molekulargewichte lassen sich relativ einfach durch Verwendung von Membranen und Filter mit geeigneter Durchlässigkeit und Porenradius durch Dialyse gewinnen.

Der Nachweis der Mitogenfreiheit geschieht in der Weise, daß die mit Calcium polymerisierte Substanz auf das Induzieren in vitro von meßbarer Proliferation von Milz-Lymphozyten überprüft wird. Zu diesem Zwecke werden Milzzellen aus Mäusen des Inzuchttamms Balb-c gewonnen. Die Zellen wurden bei einer Zellzahl von $1 \cdot 10^6 \text{ ml}^{-1}$ in Wachstumsmedium RPMI 1640 Medium, 10% fötales Kälberserum (Boehringer, Mannheim, Deutschland), 2 mM L-Glutamin, 2 mM Natriumpyruvat, nichtessentieller Aminosäure (1x, Boehringer, Mannheim, Deutschland), 50 μM 2-Mercaptoethanol, 100 units ml^{-1} Penicillin und 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ Streptomycin (Biochrom, Berlin, Deutschland) in Gegenwart von 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ der mitogenen Substanz bei 370 Celsius kultiviert. Die Lymphozyten zeigten weder einen signifikanten Einbau von ^{14}C oder ^3H -Thymidin in säurefällbare zelluläre Substanzen (nach 3 Tagen gemessen) noch ein mikroskopisch feststellbares Wachstum (mikroskopische Zellzahlbestimmung nach 5 bis 9 Kulturtagen).

Im Rahmen der Erfindung steht grundsätzlich frei, ob neben dem vorgenannten Mischpolymer zusätzliche, im Hinblick auf den Mitogenitätstest ebenfalls unbedenkliche Komponenten beigemischt sind.

Aus der Mitogenfreiheit der Substanz folgt nicht zwingend die Biokompatibilität in vivo. Vielmehr hängt letztere Eigenschaft von weiteren Faktoren, u. a. der Oberflächenbeschaffenheit des Implantats sowie dem Implantationsort ab. Dennoch ist von Vorteil die sich als biokompatibel erweisenden Verbindungen auszuwählen. Die Biokompatibilität wird anhand von Tierversuchen an Mäusen und Ratten im Hinblick auf das Auslösen von Fremdkörperreaktionen untersucht. In konkreter Durchführung werden hierzu Kapseln aus mit Barium oder Kalzium polymerisierten Substanzen hergestellt und intraperitoneal in diesen Tieren implantiert. Es trat weder ein fibrotischer Bewuchs noch eine Fremdkörperreaktion im umgebenden Gewebe auf. Im konkreten Fall wurde eine zweiprozentige Lösung der Substanz in 0,9% NaCl mit 20 mM BaCl₂ polymerisiert, wodurch sich Gelkugeln von 0,5–1 mm Durchmesser bildeten. Diese wurden mit 0,9% NaCl gewaschen, zwei Tage lang in RPMI 1640 Medium inkubiert und dann in das Peritoneum von Mäusen und Ratten implantiert. Nach drei Wochen wurden die Kapseln durch Ausspülung des Peritoneums zurückgewonnen und histologisch analysiert.

Eine weitere zusätzliche Charakterisierung der mitogenfreien Substanz macht sich die elektrophoretische Beweglichkeit zunutze und ist wie folgt: Die Substanz besteht aus einer als Mischpolymer ausgebildeten Komponenten, die aus 10 bis 90 Molprozenten Guluronsäure und komplementär, d. h. 90 bis 10% Mannuronsäure, aufgebaut ist. Die aufgrund dieser chemischen Zusammensetzung definierten und möglichen Mischpolymere können im Hinblick auf die Molekülgroße und der jeweiligen molekularen Konfiguration sehr unterschiedlich sein. Um hieraus die mitogenfreie Substanz zu gewinnen, werden die unterschiedlichen Mischpolymere einer trägerfreien Elektrophorese unterzogen, wobei

die hier interessierenden Fraktionen einer Beweglichkeit zwischen $3-5 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \Phi \text{s}^{-1}$ aufweisen.

Spezielle Versuche in diesem Zusammenhang wurden bei einer Trennkammerdimension von $30 \cdot 130 \cdot 0,3 \text{ mm}$, einer Kammerpuffertemperatur von 220°C , einer Kammerpufferzusammensetzung von $15 \text{ mM Triethanolamin}, 7,1 \text{ mM Kaliumazetat}, 216 \text{ mM Glycin} (\text{pH } 7,2)$, $11 \text{ mM Glukose}, 0,2 \text{ mM Ethylendiaminotetraazetat}, 100 \text{ Einheiten ml}^{-1} \text{ Penicillin}, 100 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1} \text{ Streptomycin}$, Leitfähigkeit $1,9 \text{ mS cm}^{-1}$. Der Puffer wurde mit einer Geschwindigkeit von $2,5 \text{ ml} \cdot \text{h}^{-1}$ durch die Kammer gepumpt. Die Pumpe wurde mit einer Rate von $350 \mu\text{l} \cdot \text{h}^{-1}$ injiziert. Die Feldstärke betrug $100 \text{ V} \cdot \text{cm}^{-1}$ (die Stromstärke 65 mA).

Als zusätzliche Bedingung muß die Substanz ein Molekulargewicht zwischen $10\,000$ und $500\,000$ Dalton aufweisen. Im Wege der Diffusion durch eine Membran lassen sich eine Separation der Mischpolymere dieses Molekulargewichtes erreichen.

Die Bedeutung der erfinderischen Leistung der hier vorgeschlagenen Substanz läßt sich daraus erkennen, daß die Fachwelt unter Hinweis auf konkrete Erfahrungen und Versuche der Auffassung ist, daß Mannuronsäure und manuronsäurehaltige Mischpolymere als Substanz selbst mitogen wäre (Fundstelle Journal of Immunotherapy 10, Seite 286–291, 1991 Raven Press, New York; Transplantation Proceedings Vol. 23, No. 1 (February) 1991, Seite 758–759). Das Verdienst vorliegender Erfindung ist die Erkenntnis der Unrichtigkeit dieser Behauptung. Hinzu kommt weiter, daß Alginat grundsätzlich mitogene Reaktionen zeigen, die jedoch — hierin liegt eine weitere entscheidende Erkenntnis — durch die aufgrund der Herleitung und Extraktion aus Naturprodukten nicht auszuschließenden Verunreinigung durch Umwelteinflüsse zurückzuführen sind.

Bei entsprechenden Herstellungsverfahren lassen sich ausgehend Rohalginaten Substanzen herleiten, die sich durch mitogenfreie Eigenschaften auszeichnen.

Im folgenden werden zwei Verfahren zur Herstellung der vorerwähnten mitogenfreien Substanzen angegeben. Im ersten finden Verfahren der trägerfreien Elektrophorese Anwendung und im zweiten erfolgt eine Gewinnung durch chemische Reaktion. Beiden Verfahren gemeinsam ist das Ausgangsmaterial Alginat, was durch Extraktion aus Pflanzen, Algen, Bakterien und dgl. gewonnen wird und käuflich erwerbar ist.

Eine bis zu 10% ige Alginatlösung wird in einen Elektrophoresepuffer mit einer elektrischen Leitfähigkeit von $2 \text{ mS} \cdot \text{cm}^{-1}$ eingegeben. Es erfolgt eine Trennung in einzelne Fraktionen unterschiedlicher elektrophoretischer Beweglichkeit, die getrennt aufgefangen werden. Es interessiert hier eine elektrophoretische Beweglichkeit von $3-5 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$. Anschließend erfolgt in einer zusätzlichen Dialyse gegen Wasser eine Separation nach der Diffusionsfähigkeit, die sich durch das Molekulargewicht unterscheidet. Zur Erhaltung einer mitogenfreien Substanz werden Molekulargewichte von $10\,000$ bis $500\,000$ Dalton aus dem gesamten Mischpolymer gewonnen.

Das nunmehr im folgenden beschriebene Herstellungsverfahren auf chemischer Basis ist dadurch charakterisiert, daß das durch Extraktion aus Pflanzen, Algen, Bakterien oder dgl. gewonnene Alginat zunächst zu einem unlöslichen Komplex vernetzt, der eine Reinigung und Extraktion sowie eine anschließende Rückgewinnung zuläßt. Bei diesem Verfahren werden die Alginate durch Zugabe von Ba^{++} -Ionen oder vergleichbaren multivalenten Kationen (Blei Pb, Kupfer Cu), die eine

vergleichbare oder höhere Affinität zum Alginat haben als Barium, ausgefällt. Anschließend erfolgt eine Extraktion durch Säure, wie beispielsweise Essigsäure, über mehrere Stunden bei erhöhter Temperatur. Nach einem Waschen folgen weitere Extraktionen mit Komplexbildnern, wie z. B. Zitronensäure, im alkalischen Bereich. Nach Waschen im destillierten Wasser werden die Gelkugeln mehrere Stunden mit Alkohol, z. B. Äthanol, geführt. Das Freisetzen der nunmehr gereinigten, jedoch nach wie vor vernetzten Alginate erfolgt durch Beigabe von EDTA (Ethylendiamin-Tetraessigsäure) im stark alkalischen Bereich. Hierbei lösen sich die Gelkugeln auf. Das Resultat ist eine aus Rohalginat gewonnene mitogenfreie Substanz.

Im folgenden wird ein auf chemischer Basis durchgeführter Herstellungsverfahren in allen Einzelheiten beschrieben:

Eine 2- bis 4%ige Lösung von Rohalginat wird über ein Membranfilter von $0,22 \mu\text{m}$ Porenweite filtriert und dann unter Röhren in das 5fache Volumen einer 50 mM -Bariumchloridlösung eingetropft, wodurch Gelkugeln von ca. $1-5 \text{ mm}$ Durchmesser entstehen. Nach 10 bis 20 Minuten erfolgt ein Waschen der Gelkugeln in destilliertem Wasser und anschließend zweimal für 3–4 Stunden in je 1 Liter 1 M Essigsäure/ 10 mM BaCl_2 bei $60-80^\circ\text{C}$ gerührt. Anschließend werden die Gelkugeln auf einem Sieb mit destilliertem Wasser gewaschen und über Nacht in zweimal 1 Liter 500 mM Zitronensäure (pH-Wert 8,0 mit KOH) gerührt, wobei nach 4 Stunden ein Mediumwechsel erfolgt. Nach nochmaligem Waschen der Gelkugeln im destillierten Wasser und für 2–3 Stunden in 500 ml 80% Ethanol werden sie anschließend für je 1 Stunde in 1 bis 2 Stunden in destilliertem Wasser gerührt.

Die Gelkugeln werden über ein Sieb dekantiert und in 200 ml einer 250 mM EDTA-Lösung (pH 10,0 mit KOH) suspendiert. Nach Röhren über Nacht haben sich die Kugeln aufgelöst. Die Lösung wird dreimal für mindestens 4 Stunden gegen 2–3 Liter destilliertem Wasser ($\text{pH } 8,5$ mit KOH) dialysiert und dann gefriergetrocknet.

Ohne Einschränkung der Allgemeinheit werden im folgenden einige Anwendungen der erfundungsgemäß angegebenen mitogenfreien Substanzen aufgezeigt. Sie haben gemeinsam, daß sie vom tierischen oder vom menschlichen Körper problemlos aufgenommen werden und auch bei langzeitlicher Anwendung die Auslösung mitogenen Reaktionen mit Sicherheit ausschließen.

Als erstes ist das Gebiet der Transplantationschirurgie zu erwähnen, bei welchem mitogenfreie Substanzen dazu eingesetzt werden können, lebende Zellen nach Art einer Kapsel einzuschließen und ohne die Auslösung immunologischer Reaktionen im Körper des Menschen implantieren zu können. Als besonders bedeutsam Beispiel wird die Einbringung von insulinzeugenden Zellen (Inseln) in die aus mitogenfreien Substanzen bestehende Kapsel angegeben, die ausweislich von Tierversuchen auch nach längerer Implantation nicht zu fibrotischem Bewuchs neigen. Gleichzeitig erlaubt die Kapsel das Eindringen der für die Aufrechterhaltung des Zellwachstums erforderlichen Nährstoffe und andererseits die Abgabe der hierbei erzeugten Hormone — im Falle der Diabetes handelt es sich um das Insulin — nach außen zu ermöglichen. Man macht sich die Durchlässigkeit für Glucose, Sauerstoff, Peptid-Hormone, zu denen das Insulin zu rechnen ist, zunutze, bei gleichzeitiger Undurchlässigkeit für größere Moleküle, z. B. der Antikörper. Das Anbringen lebender Zellen (Langerhaussche Inseln) erlauben eine ideale Anpas-

sung im Sinne eines Regelprozesses an den augenblicklichen Hormonbedarf.

Weiterhin eignet sich die Verwendung mitogenfreier Substanzen in besonderer Weise zur Beigabe zu Nahrungsmittern, wo sie bekanntlich die Gelierung und Stabilisierung unterstützen. Statistische Untersuchungen lassen Zusammenhänge zwischen der Verwendung der (bisherigen) Alginat mit der Häufigkeit der Entstehung von Krebs des Magen/Darmtraktes vermuten. Diese momentan eingesetzten Alginat sind mit Verunreinigungen versehen und deshalb, wie die Erfahrung erkannt hat, mitogen. Der Ersatz durch mitogenfreie Alginat hätte erhebliche gesundheitliche Vorteile.

Schließlich lassen sich mitogenfreie Substanzen als Wundverschlüsse bei Verletzungen, als auch innerlich bei Geschwüren, insbesondere Magengeschwüren, einsetzen. Sie können als zahnärztliche Abdruckmassen gefahrlos Verwendung finden und schließlich in der Galenik als Kapseln oder Kugeln, die als Trägersubstanz für Medikamente dienen und die sich im Magen oder Darm unter Freisetzung des eingeschlossenen Medikamentes auflösen. Gleichermaßen kann es als Trägersubstanz für Kontrastmittel dienen, in dem z. B. Luft in Bläschenform aufgenommen und eingeschlossen wird, das der Kontrastierung bei Ultraschallaufnahmen dient.

5
10
15
20
25

6. Mitogenfreie Substanz nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß sie als Implantat, vorzugsweise als im Innern mit lebenden Zellen bestückte Kapseln, in der Transplantationschirurgie verwendet werden.

7. Mitogenfreie Substanz nach einem der Ansprüche 1 bis 3, gekennzeichnet als Stabilisierungs- und Gelierzusatz für Nahrungsmitte.

8. Mitogenfreie Substanz nach einem der Ansprüche 1 bis 3, gekennzeichnet als innerlich und/oder äußerlich angewandtes Wundverschlußmaterial und/oder zahnärztliche Abdruckmasse und/oder für als Trägersubstanz für Medikamente oder Kontrastmittel dienende Kapseln und Kugeln.

Patentansprüche

1. Mitogenfreie Substanz unter Verwendung von Guluron-Säure oder Mannuron-Säure, gekennzeichnet durch Mischpolymere, die aus 10 bis 90 Molprozent Guluronsäure und aus jeweils auf 100% ergänzend Mannuronsäure bestehen sowie ein Molekulargewicht der Mischpolymere von 10 000 bis 500 000 Dalton aufweisen.
2. Substanz nach Anspruch 1, gekennzeichnet durch Biokompatibilität.
3. Mitogenfreie Substanz nach Anspruch 1, gekennzeichnet durch eine elektrophoretische Beweglichkeit der Mischpolymere von $3-5 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$.
4. Verfahren zur Herstellung der mitogenfreien Substanz nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß eine bis zu 10%ige Alginatlösung durch trägerfreie Elektrophorese in unterschiedliche Fraktionen separiert wird und anschließend die Fraktion mit einer elektrophoretischen Beweglichkeit von $3-5 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ eine Dialyse zur Separierung der Moleküle mit einem Gewicht von 10 000 bis 500 000 Dalton erfolgt.
5. Verfahren zur Herstellung einer mitogenfreien Substanz nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Alginatlösung durch die Zugabe von Barium oder multivalenten Kationen (z. B. Blei Pb, Kupfer Cu), die eine vergleichbare oder höhere Affinität zum Alginat als Barium haben, zu einem unlöslichen Komplex ausgefällt werden, dann eine Extraktion durch Säure, z. B. Essigsäure, über mehrere Stunden bei hoher Temperatur erfolgt, anschließend nach einer Waschung eine weitere Extraktion mit Komplexbildner, z. B. Zitronensäure, im alkalischen Bereich über mehrere Stunden vorgenommen wird, nach einem weiteren Waschen mit destillierten Wasser eine Behandlung über mehrere Stunden mit Alkohol, z. B. Ethanol, und schließlich ein Freisetzen der Alginat durch Zugabe von EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure) im stark-alkalischen Bereich erfolgt.

30
35
40
45
50
55
60
65